

高产虾青素的红发夫酵母菌种的选育*

王 普 裘娟萍 郑裕国 沈寅初

(浙江工业大学生物工程研究所 杭州 310014)

摘要: 红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 是发酵法生产虾青素的优良菌株。本文采用 Cs^{137} - γ 射线重复辐照, 并交替进行亚硝基胍 (NTG) 诱变处理, 选育得到一株高产虾青素的红发夫酵母 YB-20-29 突变株。该菌株摇瓶发酵的生物量达 36.32 g/L, 总色素含量为 1216.0 $\mu\text{g/g}$, 较原始菌株提高 308%, 虾青素产量达 30.9 $\mu\text{g/mL}$, 是一株很有开发前景的虾青素高产菌株。

关键词: 虾青素, 红发夫酵母, 菌种选育, 辐照

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0015-05

BREEDING OF *PHAFFIA RHODOZYMA* FOR ASTAXANTHIN OVER-PRODUCTION

WANG Pu QIU Juan-Ping ZHENG Yu-Guo SHEN Yin-Chu

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract: *Phaffia rhodozyma* is a good strain for astaxanthin production. An over-producing mutant YB-20-29 was obtained by means of Cs^{137} - γ ray and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) treatment. The biomass for this strain by shake culture was 36.32 g/L, the pigment content was 1216.0 $\mu\text{g/g}$, an increase of 308% compare to original strain. The astaxanthin content in broth was 30.9 $\mu\text{g/mL}$. It was a potential strain for astaxanthin over-production.

Key word: Astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, Strain breeding, Irradiation

虾青素 (Astaxanthin, 3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基- β , β' -胡萝卜素) 是一种非维生素 A 原的类胡萝卜素, 天然存在于虾、蟹壳、某些藻类和真菌中。它具有很强的抗氧化功能, 能清除体内由紫外线照射产生的自由基, 对紫外线引起的皮肤癌、糖尿病引起的白内障以及由于长时间使用电脑或看电视等视疲劳引起的近视都有很好的治疗效果。虾青素的抗氧化、淬灭自由基的能力比 β 胡萝卜素强约 1.7 倍, 比维生素 E 强约 80 倍。此外, 它还具有促进抗体的产生、增强宿主免疫功能等作用^[1], 在医药、化妆品和功能食品等方面有着广泛的应用。在水产养殖业中虾青素还广泛用作鲑鱼、鲟鱼等鱼饲料添加剂, 鱼食用后, 鱼皮和肌肉中由于积累了虾青素而呈红色, 从而可改善鱼类色泽, 提高其食用功效及商品价值, 尤其在欧、美市场很受青睐。目前虾青素的销售额已达数亿美元, 市场前景十分广阔。

虾青素的生物来源主要有甲壳类动物、雨生红球藻和红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*)^[2]。由于甲壳类动物的虾青素含量低, 大量提取不经济, 且受到来源限制。利用藻类生产培养周期较长, 需破壁释放虾青素, 大规模生产也较困难。因而, 通过红发夫

* 浙江省科委院士专项基金资助项目 (浙科鉴字) (No. 2000-268)

收稿日期: 2000-11-28, 修回日期: 2001-7-30

酵母的大量培养生产虾青素已越来越受到人们的重视^[3-4]。它具有生长速度快、可实现细胞高密度培养以及提取色素后的酵母菌体可作为饲料添加剂等优点。

采用发酵法生产虾青素的关键,是获得性能优良的高产菌株。Fang等采用有超级诱变剂之称的亚硝基胍对红发夫酵母进行诱变,得到较佳诱变株 NCHU-FS301^[5]。Calo等则采用 benomyl 和 EMS 进行诱变^[6]。吴江等采用 NTG 诱变处理,所得突变株的总类胡萝卜素含量为 214.9 $\mu\text{g/g}$ ^[7]。而采用 γ 射线辐照对产虾青素的红发夫酵母进行诱变育种国内还未见报道^[8]。本课题组通过大量的菌种选育,获得了一株很有开发前景和生产价值的高产虾青素的红发夫酵母突变株,同时对其发酵过程控制和虾青素提取工艺进行了研究,取得了较好的研究结果,得到了纯度很高的虾青素产品。本文报道通过 Cs^{137} - γ 射线辐照和亚硝基胍 (NTG) 诱变获得高产虾青素的红发夫酵母突变株的选育结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*), 系本研究所保藏菌株。

1.2 培养基及培养条件

平皿分离培养基及斜面培养基: 葡萄糖 10g、酵母膏 3g、蛋白胨 5g、琼脂 20g, 3° Bx 麦芽汁定容 1 L, 22°C 培养 5~6 d。摇瓶发酵培养基: 淀粉水解糖液 12g、蔗糖 48g、酵母膏 4g、玉米浆 3g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g、 KH_2PO_4 0.5g、 K_2HPO_4 2g、 CaCl_2 0.01g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, 定容 1 L, pH 6.0。22°C 于往复式摇床 100 r/min 培养 120 h, 接种量为一满环, 摇瓶装量为 500 mL 三角瓶装 40 mL 培养基。

1.3 主要仪器

HITACHI CR20B2 高速冷冻离心机, 日本产; 722 型光栅分光光度计, 上海分析仪器总厂; 电子天平, 上海分析仪器厂; 岛津 LC-10AS 液相色谱仪, 日本产。

1.4 诱变方法

1.4.1 γ 射线辐照处理: 辐照诱变处理委托浙江省农科院辐照中心进行, 采用培养好的新鲜试管斜面直接进行辐照。辐照源种类为 Cs^{137} , 辐照剂量分别为 0.5 KGy、1.0 KGy、1.5 KGy、2.0 KGy 和 3.0 KGy。用无菌生理盐水将经辐照处理后的斜面菌体洗下制成菌悬液, 并经适当稀释后涂布培养皿, 于 22°C 培养 5~6d, 挑选颜色红的单菌落转接斜面, 分别接种摇瓶发酵后测定不同诱变株的虾青素产量。

1.4.2 NTG 诱变处理: 取培养 4d 的试管斜面, 用 3mL 无菌生理盐水洗下菌体制成菌悬液, 经玻璃珠振荡打散和过滤后, 调整菌悬液细胞数至 10^8 个/mL 左右, 吸取 0.2mL 上述菌液涂平板。于平板中心放少许亚硝基胍结晶, 然后将平板倒置于 22°C 恒温培养箱中培养 7d。在放有亚硝基胍的位置周围出现抑菌圈。挑取平板边缘颜色较红的菌苔到装有 5mL 无菌生理盐水的试管中摇匀, 经适当稀释后涂平板。从培养好的平板中挑选颜色红的单菌落转接斜面, 供摇瓶发酵使用。

1.4.3 菌种诱变程序: 出发菌株 (ZG-3、ZG-5) \rightarrow γ 射线辐照 \rightarrow NTG 诱变处理 \rightarrow 分离、纯化 \rightarrow γ 射线重复辐照 \rightarrow 较佳诱变株 YB-20-29。

1.5 分析方法

1.5.1 总色素含量分光光度法比色测定: 将发酵液离心后所得的湿菌体用二甲基亚砷和甲醇萃取胞内类胡萝卜素, 萃取液在波长 474 nm 处测定吸光度。

1.5.2 HPLC法测定虾青素含量:采用日本岛津 LC-10AS 液相色谱仪分析, 色谱柱为日本岛津 Shim-pack CLC-ODS, $5\mu\text{m}$, $\varphi 6 \times 150\text{mm}$ 。流动相为甲醇:乙腈:四氢呋喃 = 85:10:5, 流速为 $1\text{mL}/\text{min}$, 紫外检测器检测, 检测波长为 480nm 。

1.5.3 生物量测定:取 10mL 发酵液, 于 $15000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min , 收集菌体, 经蒸馏水洗涤后, 再于 $15000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min , 弃去上清液, 湿菌体经烘干至恒重后称量。

2 结果

2.1 γ 射线辐照处理

2.1.1 诱变出发株的确定:经对本研究所收集保藏的 200 余株红酵母进行摇瓶初筛和复筛, 确定以红发夫酵母 ZG-3 和 ZG-5 两株菌作为诱变育种的出发菌株。

2.1.2 不同辐照剂量下的诱变结果比较:针对 ZG-3 和 ZG-5 两株不同的出发菌株, 分别经 1.0KGy 、 1.5KGy 、 2.0KGy 和 3.0KGy 4 种剂量诱变处理后, 从分离平板中挑取颜色较红的单菌落转接斜面, 并经摇瓶发酵测定诱变株的虾青素产量。不同辐照剂量下的诱变结果(见表 1)表明, 较适的辐照剂量范围为 $1.0\sim 2.0\text{KGy}$ 。对 ZG-5 出发株而言, 产量最高正变株出现在 1.5KGy 的诱变剂量下, 而对 ZG-3 菌株而言, 则出现在 2.0KGy 处。

表 1 不同辐照剂量下的诱变结果比较

辐照剂量 (KGy)	正变率 (%)		产量最高正变率 (%)	
	ZG-5	ZG-3	ZG-5	ZG-3
1.0	46.3	4.2	14.6	4.8
1.5	37.5	16.7	26.1	7.6
2.0	38.0	42.9	6.9	12.5
3.0	3.8	12.4	8.2	5.6

2.1.3 辐照诱变株的虾青素产量:对挑选的诱变株, 逐一接种摇瓶发酵, 分别测定生物量、 OD_{474} 值(即总色素含量)、发酵液残糖量、pH 值等参数。对总色素含量较高的发酵液, 采用 HPLC 法分析其虾青素含量。部分诱变株的摇瓶发酵结果见表 2。结果表明, 某些诱变株的总色素含量以及虾青素产量均较出发菌株有较大幅度的提高, 尤其是 533 株的产量最高, 每克干菌体的虾青素含量达 $475.9\mu\text{g}$, 较出发株提高 63.7% , 虾青素产量为 $12.4\mu\text{g}/\text{mL}$, 较出发株提高 59.7% , 诱变结果较好。由于虾青素属次级代谢产物, 试验中发现红发夫酵母的生物量与虾青素合成不呈现正相关, 有些诱变株摇瓶发酵时生物量较高, 但菌体合成虾青素的能力不一定强。因此, 筛选菌种时应以虾青素产量作为考察的主要指标。

表 2 部分诱变株的摇瓶发酵结果

菌株	生物量 (g/L)	总色素含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	HPLC 分析结果		
			虾青素含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	占总色素比例 (%)	虾青素产量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
ZG-5	26.62	394.3	290.7	66.76	7.7
533	26.00	564.4	475.9	67.18	12.4
5413	27.50	484.8	393.5	66.31	10.8
ZG-3	20.66	459.8	307.0	56.81	6.3
3212	23.00	536.0	471.0	75.75	10.8
328	28.00	482.0	395.2	79.62	11.1

此外，试验中还发现培养结束的发酵液放冰箱冷藏一段时间后颜色会逐渐变红，虾青素含量也有所提高，结果见表3。

表3 冰箱冷藏对发酵液中虾青素含量的影响

冷藏时间 (d)	对照	冷藏 7d	冷藏 24d
总色素含量 (μg/g)	564.4	609.3	763.2
虾青素含量 (μg/g)	475.9	506.3	585.0
占总色素比例 (%)	67.18	71.10	60.73

注：供试菌株为533株，虾青素含量采用HPLC法测定进行菌种的纯化、复壮工作非常必要。

2.2 NTG 诱变处理

将经辐照诱变得到的533菌株进一步采用亚硝基胍(NTG)进行诱变，并接种摇瓶发酵测定后，对较好的诱变株进行分离、纯化，从中优选出3株菌进行γ射线的重复辐照诱变。3株菌编号分别为YB-20，BH-8和F-II。

2.3 γ射线重复辐照诱变

2.3.1 不同辐照剂量下的诱变结果：针对3株不同的出发菌株，分别采用0.5 KGy、1.0 KGy、1.5 KGy和2.0 KGy 4种剂量进行γ射线的重复辐照处理。不同出发株的诱变结果见表4。

表4 不同出发株的诱变结果比较

出发株编号	较佳处理剂量(KGy)	较佳诱变株的OD ₆₂₄ 值
BH-8	0.5	0.502
F-II	1.0	0.515
YB-20	1.0	0.530

图1为YB-20出发菌株在不同辐照剂量下的诱变结果。较适的辐照剂量范围以1.0~1.5KGy为好，相应的致死率在90%以上。

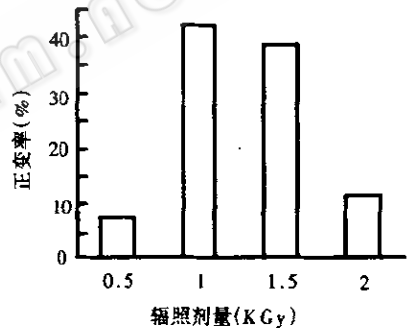


图1 不同辐照剂量的诱变结果比较

2.3.2 γ射线重复辐照诱变株的虾青素产量：将经γ射线重复辐照的诱变株逐一接种摇瓶发酵测定，得到较佳的诱变株YB-20-29，其总色素含量为1216.0 μg/g，较原始菌株提高308%，虾青素产量达30.9 μg/mL，较原始菌株提高401%。

在对诱变株的摇瓶发酵考察中发现，部分诱变株在斜面培养时菌体颜色较红，但接种摇瓶培养后，发酵液颜色呈灰白、肉色或略带棕色等不同色泽，甚至出现白色，虾青素产量也较亲株明显降低。说明这些诱变株对培养基及培养条件的要求与亲株差异较大。

3 讨论

利用酵母菌发酵生产虾青素，施安辉等人采用粘红酵母突变株BF-6^[9]，国外有人采用从保加利亚酸牛奶中分离的深红酵母，但更多的研究集中在红发夫酵母。国内也有采用红发夫酵母生产虾青素的报道，然而发酵水平不太理想，类胡萝卜素产量为14.92 μg/mL，虾青素比例为78%^[10]，距工业化生产仍有距离。本课题组通过采用

Cs¹³⁷- γ 射线和 NTG 诱变处理, 选育得到一株高产虾青素的红发夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) YB-20-29 突变株, 该菌株摇瓶培养时生物量达 36.32 g/L, 总色素含量为 1216.0 $\mu\text{g/g}$, 虾青素产量为 30.9 $\mu\text{g/mL}$ 。经 30L 罐多批次发酵, 虾青素产量达 40 $\mu\text{g/mL}$ 以上, 是一株很有开发前景的优良菌株。研究中还发现, 培养基和培养条件对充分发挥诱变株产虾青素的能力也是至关重要的。有关红发夫酵母产虾青素的影响因素及培养条件的优化将另文报道。

参考文献

- [1] 王菊芳, 吴振强, 梁世中. 食品与发酵工业, 2000, 26 (2): 66~69.
- [2] 朱明军, 林炜铁, 吴海珍, 等. 食品与发酵工业, 2000, 26 (2): 70~74.
- [3] Meyer P S, Du Preez J C. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 40 (6): 780~785.
- [4] Fontana J D, Guimaraes M F, Martins N T, et al. Appl Biochem Biotechnol, 1996, 57/58: 413~422.
- [5] Fang T J, Chiou T Y. J Indust Microbiol, 1996, 16: 175~178.
- [6] Calo P, Velazquez J B, Sieiro C, et al. J Agric Food Chem., 1995, 43 (5): 1396~1399.
- [7] 吴江, 刘子贻, 朱寿民. 微生物学通报, 2001, 28 (2): 33~37.
- [8] 裘娟萍, 沈寅初. 工业微生物, 2000, 30 (4): 55~57.
- [9] 施安辉, 萧海杰. 生物工程进展, 1999, 19 (1): 29~31.
- [10] 徐学明, 金征宇, 刘当惠, 等. 无锡轻工大学学报, 2000, 19 (3): 230~235.